



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 105 983**

21 Número de solicitud: 9502361

51 Int. Cl.<sup>6</sup>: C07D 305/14

C07D 407/12

A61K 49/00

A61K 41/00

12

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: 29.11.95

43 Fecha de publicación de la solicitud: 16.10.97

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
16.10.97

71 Solicitante/s:  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Serrano, 117  
28006 Madrid, ES

72 Inventor/es:  
Amat Guerri, Francisco; Souto, Andre A.;  
Acuña, A. Ulises; Andreu, J. Manuel;  
Barasoain, Isabel y  
Abal, Miguel

74 Agente: No consta

54 Título: **Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica y método para obtenerlos.**

57 Resumen:

Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica y método para obtenerlos. Se ha sintetizado derivados intensamente fluorescentes de una sustancia utilizada actualmente como anticancerígeno (quimioterapia), contra tumores de ovario y mama entre otros. Estos derivados permiten visualizar la diana celular de dicho fármaco, ya que la derivatización no ha modificado la actividad biológica. No existe ningún compuesto que presente las características de solubilidad, actividad y fluorescencia de los aquí descritos. Aplicaciones en investigación biológica en general y oncológica.

ES 2 105 983 A1

## DESCRIPCION

## 1. Título

Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica, y método para obtenerlos

## 2. Sector de la técnica

1) farmacéutico-bioquímico; 2) compuestos para el análisis de la diana celular de los fármacos anticancerosos paclitaxel y docetaxel, y para la terapia anticancerosa directa o fotodinámica.

## 3. Estado de la técnica

Paclitaxel (o taxol, marca registrada por Bristol-Myers Squibb), un diterpenoide natural que se extrae de la corteza del tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia*, y su análogo de síntesis docetaxel (10-desacetil-3'-(N-desbenzoil)-3'-(N-tertbutiloxycarbonil)paclitaxel, otaxotere, marca registrada por Rhône-Poulenc) están actualmente entre las más prometedoras drogas anticancerosas debido a su capacidad para estabilizar los microtúbulos del citoesqueleto y, por consiguiente, para inhibir la división celular. Sin embargo, ambos fármacos presentan varios inconvenientes en su utilización en terapia humana, principalmente una solubilidad muy reducida en el plasma sanguíneo, así como varios efectos secundarios. Un buen número de laboratorios implicados en la lucha contra el cáncer dirigen actualmente su atención a la obtención de nuevos fármacos anticancerosos por modificación química de estas dos moléculas de taxanos, así como a la aclaración de su mecanismo de acción bioquímica. Algunos de los inventores de la presente patente han descrito las estructuras de los microtúbulos formados por la acción de paclitaxel (Andreu y cols., *J. Mol. Biol.* 1992, 226, 169 y *J. Biol. Chem.* 1994, 50, 31785), el ensamblaje de GDP-tubulina en presencia de taxoides y la relación entre la reacción de unión de paclitaxel y la de formación de microtúbulos (Díaz y cols., *Biochemistry* 1993, 32, 2747 y 10067).

Para los investigadores que estudian los microtúbulos celulares y el mecanismo de acción de estas drogas sería de inmediata utilidad disponer de un derivado luminiscente (ya que ni paclitaxel ni docetaxel lo son) que, además, fuese suficientemente soluble en agua. Esto permitiría: a) el estudio directo *in vivo*, mediante microscopía de fluorescencia, de los microtúbulos diana en los cultivos celulares, y b) disponer de una poderosa herramienta para estudiar el mecanismo molecular del ensamblaje de los microtúbulos inducido por estos taxanos, y para descubrir otras posibles dianas de las drogas dentro de la célula. Por otra parte, la observación directa, de una manera sencilla, de las células en las que el taxano ha ejercido su efecto permitiría desarrollar nuevos métodos de análisis y de diagnóstico relacionados con el tratamiento de pacientes con estas drogas. Además, las específicas propiedades fotoquímicas de los colorantes se podrían utilizar como ruta adicional en la destrucción de la célula cancerosa.

Algunos derivados fluorescentes de ambos taxanos se han descrito ya en la bibliografía. Sin embargo, el éxito de su aplicación a los anteriores objetivos ha sido hasta ahora muy limitado. Se ha descrito un derivado de paclitaxel que po-

see un grupo dansilo en la posición 7, unido a través de un grupo de  $\beta$ -alanina como espaciador (Kingston, *Pharmac. Ther.* 1991, 52, 1), aunque la bioactividad de este compuesto está pendiente de demostración. También se ha dado cuenta de dos derivados fluorescentes de paclitaxel con grupos amino en su molécula: uno con un grupo m-amino en el benzoilo en posición 2 (Han y cols., *Mol. Biol. Cell* 1994, 5, 284a), pero el derivado es menos activo que la droga de la que procede, y otro con un grupo m-dimetilamino en el benzoilo en posición 3' (Sengupta y cols., *Biochemistry*, 1995, 34, 11889) cuya actividad biológica es similar a la de paclitaxel. La fluorescencia de estos dos aminoderivados es baja, aunque mayor que la del propio paclitaxel, y los valores de los coeficientes de extinción molar son pequeños. Esto hace que para su detección sea necesario utilizar altas concentraciones del derivado fluorescente. Cuando esto no es posible, dicha detección no se puede realizar. Asimismo se han descrito varios derivados fluorescentes de docetaxel con un grupo 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazo-4-ilo en la posición 7, o en la 3' de su derivado 3'-NH-desacilado, o bien con un grupo biotina en las posiciones 7, 10 o 3' (Dubois y cols., *Bioorg. Med. Chem.*, 1995, 10, 1357). En todos estos últimos compuestos los grupos fluorescentes están unidos al esqueleto de paclitaxel a través de un grupo 6-aminocaproico como espaciador. Sin embargo, sus actividades biológicas en células vivas parecen discrepantes, y tiñen defectuosamente los microtúbulos celulares. Por último, existe comercialmente disponible (*Molecular Probes*, Holanda) un derivado de 3'-NH-desbenzoilpaclitaxel fluorescente (BODIPY-FL-Taxol, marca registrada) que posee un grupo de pirrometeno.BF<sub>2</sub> sustituido en el grupo NH en dicha posición 3', pero cuya solubilidad en agua es baja, lo que nuevamente limita considerablemente su empleo.

Una alternativa para visualizar el sistema de microtúbulos celulares consiste en utilizar las bien conocidas técnicas de inmunofluorescencia, por ejemplo mediante un anticuerpo fluorescente anti-tubulina. Estas técnicas, comercialmente disponibles, son indirectas, complejas y laboriosas, y permiten observar el sistema de microtúbulos sólo después de que éstos hayan interaccionado con el taxano. Obviamente, estas técnicas de inmunofluorescencia no podrían substituir a las basadas en una molécula de paclitaxel o docetaxel fluorescente, porque en aquellas los microtúbulos interaccionan con una proteína (IgG o sus fragmentos), y porque tanto la posición como la forma de actuación de dicha proteína y del taxano anticanceroso deben ser diferentes.

## 4. Descripción de la invención

4.1 La presente invención está basada en la obtención de derivados de los agentes anticancerosos paclitaxel y docetaxel que, además de conservar la bioactividad, emiten fluorescencia al ser excitados con luz visible. Esta propiedad permite, mediante microscopía de fluorescencia, detectar: a) las células que han reaccionado con la droga, y b) a qué parte de la célula se ha unido dicha droga. Los derivados de paclitaxel y de docetaxel cuya obtención y empleo aquí se patentan permiten además transportar al interior de la célula

mayores concentraciones de la droga anticancerrosa. Por otra parte, usando el mismo método de obtención, pueden unirse a la droga grupos moleculares que, al ser iluminados con luz visible, generen productos tóxicos para la célula.

4.2 Más concretamente, la invención describe la obtención y el empleo de derivados de paclitaxel o docetaxel que poseen un grupo cromóforo, unido al núcleo de la droga por la posición 7 a través de un espaciador. Es bien sabido que las modificaciones en el hidroxilo en esta posición 7 en la molécula de paclitaxel no afectan apreciablemente a la actividad biológica de la droga. Los numerosos derivados aquí patentados se obtienen básicamente por un procedimiento químico que comprende dos pasos:

Primer paso: esterificación selectiva del grupo alcohólico en la posición 7 de la molécula de paclitaxel o docetaxel con ácidos carboxílicos que poseen en su molécula al menos un grupo amino primario libre. Esta reacción puede llevarse a cabo de diferentes modos, en general en varios pasos, siempre con aminoácidos con el grupo amino adecuadamente protegido, y con protección química adicional de los grupos del taxano que también puedan esterificarse. En la presente invención se ha usado preferentemente un procedimiento que comprende tres etapas, básicamente similares a las descritas por Mathew y cols en *J. Med. Chem.* 1992, 35, 145 para la esterificación en posición 7 de paclitaxel con L-alanina: 1) esterificación de los grupos alcohólicos en posiciones 7 y 2' de paclitaxel o docetaxel con un aminoácido con el grupo amino protegido (por ejemplo, con el grupo N-tertbutoxicarbonilo); 2) desprotección de ambos grupos amino en el diéster por reacción con ácido fórmico; y 3) hidrólisis acuosa selectiva del grupo éster en posición 2'. El aminoácido que se emplea para esterificar la posición 7 puede tener el grupo amino primario separado del carboxílico por una cadena de 1 a 18 carbonos, lineal o ramificada, o por un grupo fenileno, con o sin sustituyentes alquílicos, y puede ser cualquiera de los  $\alpha$ -L-aminoácidos naturales conocidos, como glicina, alanina, prolina, etc., sus D-isómeros, las mezclas racémicas correspondientes, o cualquier compuesto que posea simultáneamente en su molécula los grupos ácido carboxílico y amino primario.

Segundo paso: unión covalente de un cromóforo luminiscente (fluorescente o fosforescente) a dicho grupo amino del derivado de paclitaxel o docetaxel obtenido en el primer paso, mediante reacción con una molécula de un colorante que posee un grupo con reacción selectiva con grupos amino. El grupo específico de la molécula de colorante que reacciona con el grupo amino del derivado de paclitaxel o docetaxel puede ser cualquiera de los que se conocen por su alta afinidad reactiva frente a aminas primarias, tales como isocianatos, isotiocianatos, succinimídilésteres, ácidos carboxílicos o sus haluros y ácidos sulfónicos o sus haluros. El colorante con el anterior grupo reactivo de aminas primarias es siempre un derivado de otro colorante, elegido entre los de las familias de los colorantes fluorescentes: xantenos (fluoresceína, Fioxina, Eosina, Eritrosina, Rosa de Bengala, etc.), tiacinas (tionina, Azul de Metileno, Azure A, Azure B, etc.), ro-

daminas (Rodamina B, Rodamina 3B, Rodamina 19, Rodamina 6G, Rodamina 101, Rodamina 123, etc), cumarinas, porfirinas, aminonaftalenos, hidrocarburos policíclicos, polienos, y complejos de pirrometenos con trifluoruro de boro, que se unen al derivado de paclitaxel o docetaxel por el grupo amino libre existente en el sustituyente en la posición 7 de la droga.

Las únicas limitaciones de las anteriores reacciones de esterificación en posición 7 con un aminoácido y posterior sustitución del grupo amino del derivado de paclitaxel o docetaxel con un resto de colorante son:

1) las reacciones no deben alterar la estructura molecular del núcleo de paclitaxel o docetaxel, excepto en lo que se refiere a la esterificación de su posición 7, ni la del núcleo cromofórico del colorante;

2) las propiedades biológicas del derivado luminiscente de paclitaxel o docetaxel deben ser idénticas, o muy similares, a las del correspondiente taxano sin sustituir;

3) las propiedades de absorción y emisión de luz del cromóforo unido a la molécula de paclitaxel deben ser muy similares a las del colorante correspondiente en estado libre;

4) las propiedades de solubilidad en agua del derivado de paclitaxel o docetaxel finalmente obtenido deben ser tales que permitan su rápido paso a través de la membrana celular, sí como su fácil disolución en el medio acuoso citoplasmático.

Una interesante aplicación de todos estos derivados es el empleo como fotosensibilizadores para la terapia fotodinámica anticancerrosa, especialmente los derivados que llevan incorporados cromóforos que poseen altos rendimientos cuánticos en la generación de la especie activa oxígeno molecular singlete. Esta aplicación está basada en la capacidad de paclitaxel y docetaxel para atravesar la membrana celular y unirse a la tubulina y a los microtúbulos del citoesqueleto. La célula así marcada puede ser irradiada con luz visible, que sería absorbida por el cromóforo unido al taxano, dando lugar a la generación de oxígeno singlete, un fuerte oxidante que provocaría la destrucción, no solo lo de la célula marcada, sino también de las que se encuentren próximas.

## 5. Descripción del esquema

El esquema muestra las estructuras moleculares de paclitaxel y docetaxel, las correspondientes moléculas conteniendo el espaciador  $-CO-R^1-NH_2$  en la posición 7, y la estructura resultante de unir un colorante genérico,  $R^2$ -colorante, por reacción con el grupo  $NH_2$  del espaciador, así como los posibles grupos  $R^2$  con reacción selectiva con grupos aminos primarios. La parte inferior del esquema muestra las estructuras de los tres derivados de paclitaxel que sirven de ejemplo en esta invención, con el cromóforo de una cumarina, una rodamina o fluoresceína en la molécula.

## 6. Ejemplos de realización

A título ilustrativo, y sin que sea considerado como limitación al alcance de la presente patente, a continuación se ilustran ejemplos de la unión química de tres colorantes, una cumarina, una rodamina y un xanteno, a la posición 7 de la molécula de paclitaxel, a través de un

espaciador de L-alanina, así como un ejemplo práctico del empleo de uno de ellos, el derivado con el grupo fluoresceína, para la visualización de los microtúbulos celulares. Se han elegido estos tres fluoróforos porque muestran propiedades químicas, espectroscópicas y fotofísicas que son óptimas para los fines perseguidos en la presente invención: altos coeficientes de absorción a longitudes de onda alejadas de la absorción intrínseca de las proteínas, y próximas a los máximos de emisión de los láseres comerciales disponibles, así como altos rendimientos en la emisión de fluorescencia, y valor elevado de la polarización de la emisión (anisotropía).

#### Ejemplo 1:

##### *Obtención de paclitaxel-alanina-cumarina* (ver fórmula)

A una disolución de 7-(L-alanil)paclitaxel sin purificar (10 mg, 10.8 mmol) (obtenido a partir de paclitaxel, con un rendimiento total del 70%, siguiendo básicamente el procedimiento descrito por Mathew y cols., *J. Med. Chem.* 1992, 35, 145), y trietilamina (15  $\mu$ L, 108  $\mu$ mol) en dioxano (1 mL) se añade otra de 7-dimetilaminocumarin-4-acetato de succinimidilo comercial (5.6 mg, 16.2  $\mu$ mol) en dioxano (0.5 mL). Tras agitar durante 24 horas a temperatura ambiente en la oscuridad, el disolvente se elimina a vacío. El producto crudo paclitaxel-alaninacumarina se purifica por cromatografía en capa fina preparativa (gel de sílice, acetato de etilo-diclorometano 1:1 como eluyente). Rendimiento: 9.5 mg (77 %). Punto de fusión: 182-185°C. Pureza por cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) > 96 % (columna C-4, desde el 20 al 80 % de acetonitrilo en agua como eluyente). Solubilidad en agua: 1  $\mu$ M. El producto se identifica por espectrometría de masas con bombardeo de átomo pesado (MS-FAB<sup>+</sup>) y por resonancia magnética nuclear de protón,

#### Ejemplo 2:

##### *Obtención de paclitaxel-alanina-rodamina* (ver fórmula)

A una disolución de 7-(L-alanyl)paclitaxel sin purificar (10 mg, 10.8 mmol) (obtenido como se dice antes) en una mezcla de dimetilforma-

mida (1 mL) y tampón acuoso de pH 9 (carbonato/bicarbonato) (1 mL) se añade otra disolución de tetrametilrodamina-4'-carboxilato de succinimidilo comercial (8.6 mg, 16.2 mmol) en la misma mezcla de disolventes (1 mL). Tras agitar 2 horas, se separa el disolvente a vacío, y el producto crudo paclitaxel-alanina-rodamina se purifica por cromatografía en capa fina preparativa (gel de sílice, acetato de etilodichlorometano 1:4). Rendimiento: 7.9 mg (55 %). Pureza (por HPLC, condiciones como antes) > 92 %. El producto se identifica como antes.

#### Ejemplo 3:

##### *Obtención de paclitaxel-alanina-fluoresceína* (ver fórmula)

Siguiendo las mismas condiciones, proporciones y método de purificación que en el caso de la obtención del derivado paclitaxel-alanina-rodamina, se obtienen 8.0 mg (60 %) de producto. Punto de fusión > 300°C. Pureza (HPLC) > 92 %. Solubilidad en agua: 300  $\mu$ M (solubilidad de paclitaxel en el mismo medio: 5  $\mu$ M, según Nicolaou y cols., *Nature* 1993, 364, 464). El producto se identifica como antes.

#### Ejemplo 4:

##### *Observación mediante microscopía de fluorescencia de los microtúbulos celulares con ayuda del colorante vital paclitaxel-alanina-fluoresceína*

Células PtK2 se tratan con el derivado paclitaxel-alanina-fluoresceína (1  $\mu$ M), se lavan con disolución salina de tampón de fosfato, se montan sin fijación en una disolución de tampón de glicina 0.13 M de pH 8.6, cloruro sódico 0.20 M y glicerina al 70 % (de acuerdo con lo descrito por Inés y cols., *Cancer Res.* 1994, 54, 75), y se observan con un microscopio de epi-fluorescencia. Los microtúbulos citoplásmicos son perfectamente visibles, así como los husos en las células en proceso de división. La calidad de la imagen es al menos semejante a la que se obtiene mediante procedimientos habituales de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos anti-tubulina sobre células fijadas, distinguiéndose microtúbulos individuales.

## REIVINDICACIONES

1. Derivados de los taxanos paclitaxel y docetaxel y el método para obtenerlos. Estos derivados se caracterizan porque contienen en su molécula un grupo cromofórico luminiscente unido a la molécula original del taxano por la 5 posición 7 a través de un espaciador.

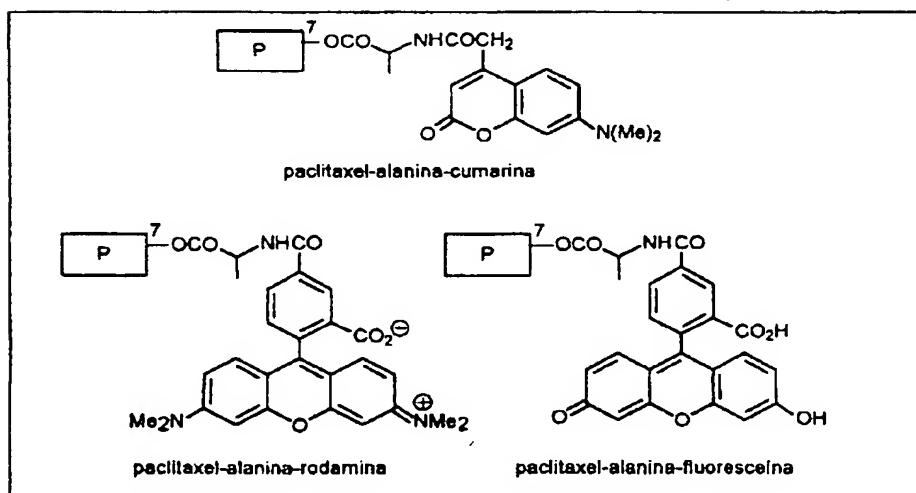
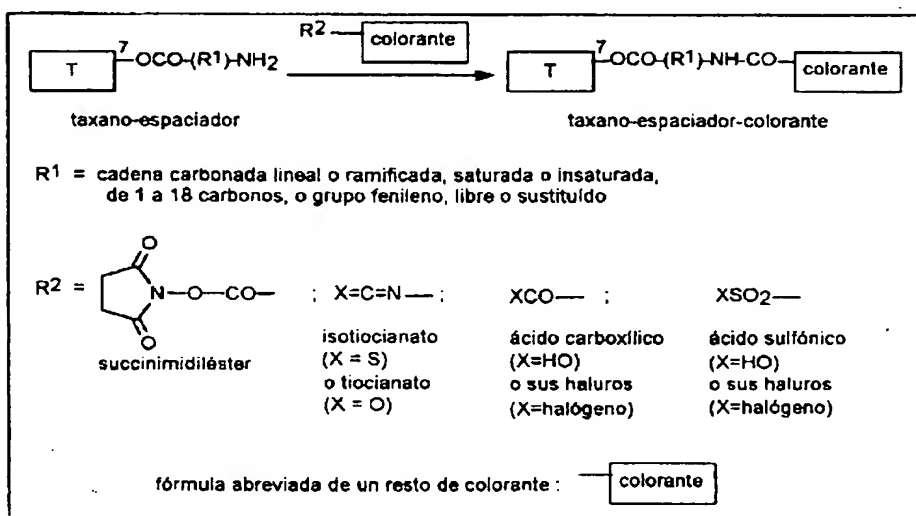
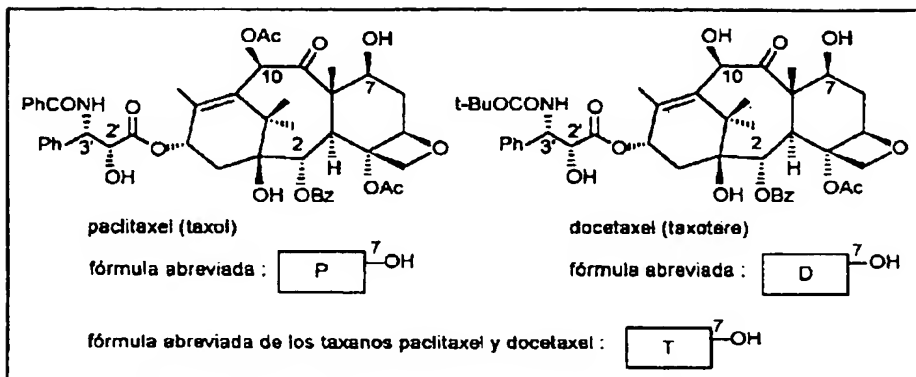
2. Derivados de los taxanos paclitaxel y docetaxel según la reivindicación 1, caracterizados porque el método para obtenerlos posee dos etapas consecutivas. En la primera etapa el grupo alcohólico en la posición 7 del taxano se esterifica selectivamente con un ácido carboxílico que tiene en su molécula un grupo amino primario. En la segunda etapa se hace reaccionar el aminoderivado del taxano, obtenido en la primera etapa, con un colorante que posee en su molécula un grupo con reacción selectiva con grupos aminos primarios. Los grupos amino primario y ácido carboxílico en el aminoácido están separados por una cadena de 1 a 18 carbonos, lineal o ramificada, o por un grupo fenileno, con o sin sustituyentes alquílicos. Dicho aminoácido puede ser cualquiera de los  $\alpha$ -L-aminoácidos naturales conocidos, como glicina, alanina, prolina, etc, sus D-isómeros, las mezclas racémicas correspondientes, o cualquier compuesto que posea simultáneamente en su molécula los grupos ácido carboxílico y amino primario. El grupo con reacción selectiva con grupos aminos primarios puede ser isocianato, isotiocianato, succinimidiléster, ácido carboxílico o haluro de ácido carboxílico, y ácido sulfónico o haluro de ácido sulfónico. El colorante con el anterior grupo reac-

tivo de aminas primarias es siempre un derivado de otro colorante, elegido entre los de las familias de los colorantes xanténicos (fluoresceína, Floxina, Eosina, Eritrosina, Rosa de Bengala), las tiacinas (tionina, Azul de Metileno, Azure A, Azure B), las rodaminas (Rodamina B, Rodamina 3B, Rodamina 19, Rodamina 6G, Rodamina 101, Rodamina 123, Rojo Texas), cumarinas, porfirinas, aminonaftalenos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (naftaleno, antraceno, fenantreno, pireno), polienos lineales o ramificados con un mínimo de tres dobles enlaces conjugados, y complejos de pirrometenos con trifluoruro de boro.

3. Derivados de los taxanos paclitaxel y docetaxel y el método para obtenerlos según la reivindicación 1, caracterizados porque poseen bioactividad similar y más alta solubilidad en agua que el taxano del que derivan.

4. Derivados de los taxanos paclitaxel y docetaxel y el método para obtenerlos según la reivindicación 1, caracterizados porque emiten fluorescencia o fosforescencia, o porque generan especies químicas citotóxicas al ser iluminados, cuando se encuentran unidos al sistema de microtúbulos de células benignas o malignas.

5. Derivados de los taxanos paclitaxel y docetaxel y el método para obtenerlos según la reivindicación 1, caracterizados porque las propiedades electrónicas del grupo cromóforo existente en su molécula son adecuadas para nuevos métodos de análisis y nuevas técnicas de diagnóstico de enfermedades cancerosas, así como para la terapia fotodinámica anticancerosa.





OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA

⑪ ES 2 105 983

⑫ N.º solicitud: 9502361

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 29.11.95

⑭ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.<sup>6</sup>: C07D 305/14, 407/12, A61K 49/00, 41/00

## DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MATHEW et al.: Synthesis and evaluation of some water-soluble prodrugs and derivatives of taxol with antitumor activity. J. Med. Chem. Vol. 35, nº 1, 10.01.92, páginas 145-151 * Página 146; ejemplo 10; resumen *	1-5
A	SENGUPTA et al.: Interaction of a fluorescent Paditaxel Analogue with Tubulin. Biochemistry. Vol. 34, nº 37, 1995, páginas 11889-11894 * Página 11890; figura 1; resumen *	1-5

<b>Categoría de los documentos citados</b> X: de particular relevancia Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría A: refleja el estado de la técnica  O: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud		
<b>El presente informe ha sido realizado</b> <input checked="" type="checkbox"/> para todas las reivindicaciones <input type="checkbox"/> para las reivindicaciones nº:		
<b>Fecha de realización del informe</b> 15.07.97	<b>Examinador</b> M. Ojanguren Fernández	<b>Página</b> 1/1

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**